



(19) RU (11) 2 199 310 (13) C2
(51) МПК⁷ А 61 К 9/08, 33/14, А 61 Р 41/00

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 99102851/14, 16.05.1997

(24) Дата начала действия патента: 16.05.1997

(30) Приоритет: 17.05.1996 US 08/649,200

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2000

(46) Дата публикации: 27.02.2003

(56) Ссылки: RU 2019965 С1, 30.09.1994. RU 2025973 С1, 09.01.1995. US 5395314, 07.03.1995. US 5137510, 11.08.1992. US 5011469, 07.03.1990.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 04.02.1999

(86) Заявка РСТ:
US 97/08205 (16.05.1997)

(87) Публикация РСТ:
WO 97/43899 (27.11.1997)

(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.поп. Н.Г. Лебедевой

(71) Заявитель:
БРЕОНИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель: БРЭСАЙЛ Лорен (US)

(73) Патентообладатель:
БРЕОНИКС, ИНК. (US)

(74) Патентный поверенный:
Егорова Галина Борисовна

R
U
2
1
9
9
3
1
0

C
2

RU 2 199 310 C 2

(54) РАСТВОР И СПОСОБ ДЛЯ ОЖИВЛЕНИЯ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКИ ПОВРЕЖДЕННОЙ ТКАНИ

(57)
Изобретение относится к медицине, а именно к консервации, сохранению и восстановлению тканей и органов. Способ представляет собой промывание органа при температуре 28 - 37°C содержащим буфер физиологическим раствором для удаления крови и ацидотических продуктов и перфузию органа при температуре 28 - 37°C

содержащим буфер физиологическим раствором, который дополнительно содержит средства для расширения сосудов, трофические факторы, средства для восстановления окислительного метаболизма и другие вещества. Предложенный способ позволяет сохранить ткани и органы для трансплантации в течение более длительного времени. 8 с. и 22 з.п. ф-лы, 5 ил., 6 табл.



(19) RU (11) 2 199 310 (13) C2
(51) Int. Cl.⁷ A 61 K 9/08, 33/14, A 61 P

41/00

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 99102851/14, 16.05.1997
(24) Effective date for property rights: 16.05.1997
(30) Priority: 17.05.1996 US 08/649,200
(43) Application published: 10.12.2000
(46) Date of publication: 27.02.2003
(85) Commencement of national phase: 04.02.1999
(86) PCT application:
US 97/08205 (16.05.1997)
(87) PCT publication:
WO 97/43899 (27.11.1997)
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. N.G. Lebedevoj

(71) Applicant:
BREONIKS, INC. (US)
(72) Inventor: BREhSAJL Loren (US)
(73) Proprietor:
BREONIKS, INC. (US)
(74) Representative:
Egorova Galina Borisovna

(54) SOLUTION AND METHOD FOR REVIVIFICATION AND RESTORATION OF ISCHEMICALLY AFFECTED TISSUE

R
U
2
1
9
9
3
1
0

C
2

(57) Abstract:
FIELD: medicine. SUBSTANCE: method deals with conservation, preservation and restoration of affected tissues and organs. The method deals with washing an organ at 28-37 °C with buffer-containing physiological solution for removal of blood and acidotic products and organ's perfusion at 28-37 °C with buffer-containing

physiological solution which additionally contains vasodilative preparations, trophic factors, preparations for restoration of oxidizing metabolism and other substances. Said method enables to safe tissues and organs for transplantation during more prolonged period of time. EFFECT: higher efficiency. 30 cl, 5 dwg, 13 ex, 6 tbl

RU
2 1 9 9 3 1 0 C 2

R U ? 1 9 9 3 1 0 C 2

R U

Область изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к консервации, сохранению и восстановлению тканей и органов. Более конкретно, настоящее изобретение обеспечивает способ, благодаря которому, при использовании композиции настоящего изобретения, восстанавливается целостность, функция и жизнеспособность ишемически поврежденного органа или ткани.

Предпосылки к созданию изобретения

Нехватка органов для трансплантации остается чрезвычайно актуальной проблемой. В настоящее время главным лимитирующим фактором в клинической трансплантации остается постоянная нехватка органов. Например, трансплантация почек сильно зависит от доступности органов, взятых от умерших доноров при еще работавшем сердце. Помимо этого, большим и еще не закрытым источником органов для трансплантации остаются трупы с неработающим сердцем. Трупы с неработающим сердцем являются жертвами несчастных случаев, которые умерли непосредственно от самого повреждения, или жили короткое время после травмы. В таких случаях причинами того, что эти органы не используются, является, в силу прекращения деятельности сердца, отсутствие циркуляции крови (теплая ишемия), которое запускает каскад повреждения.

Орган, сильно поврежденный теплой ишемией, но функционально еще сохраненный, не может перенести дальнейшего повреждения при гипотермии. В условиях гипотермии, которую применяют для консервации органов, предназначенные для трансплантации, липидные двухслойные мембранны меняют фазу и становятся похожими на гель, со значительным уменьшением текучести. Сильно замороженный липид в клеточных мембранных не позволяет утилизировать кислород, даже в присутствии высокого давления О₂. Метаболическим последствием этого является гликолиз, который аналогичен состоянию гипоксии. Описано, что при температуре ниже 18°C гипотермия ингибирует активность каналцев почек и что при 4°C утилизация кислорода составляет приблизительно 5% от нормы.

Гипотермическое хранение может также вызвать вазоспазм с последующим отеком органа. У сохраняемых в условиях гипотермии органов может появляться набухание гломерулярных эндотелиальных клеток и нарушение целостности сосудов с некрозом каналцев; наблюдается феномен, присущий гипотермическим условиям. Гипотермия может также ингибировать Na/K-зависимую АТФазу и приводить к утрате способности клеток регулировать объем. Именно утрата регуляции объема вызывает набухание и повреждение клеток. Достаточное снабжение кислородом может активно уменьшать степень этого набухания. Без адекватной доставки кислорода гипоксия приводит к дезинтеграции мелких сосудов после нескольких часов перфузии. Недостаток кислорода и последующее истощение запасов АТФ означает, что анаэробный гликолиз является главным источником энергии при традиционных условиях консервации. Недостаток молекулярного

кислорода для окислительного фосфорилирования, который наблюдается при ишемии, приводит к накоплению НАДФ и истощению запасов АТФ в митохондриях. Последующая потеря нуклеозидов является, по-видимому, очень важным фактором в неспособности тканей, подвергшихся теплой ишемии и продолжительным периодам холодной ишемии, восстановить АТФ после возобновления кровоснабжения. Из-за неспособности обеспечить адекватное снабжение кислородом остается полагаться на рутинную гипотермию для консервации органов.

Таким образом, ишемия (теплая или холодная) является каскадом повреждения и ее можно характеризовать как прелетальную фазу и летальную фазу. Прелетальная фаза воздействует повреждающее тремя путями: гипоксией, недостаточностью питания и неспособностью удаления токсических отходов обмена веществ. С прекращением циркуляции крови прекращается приток молекулярного кислорода. Наступившая гипоксия вызывает истощение энергетических запасов, таких как истощение запасов АТФ в митохондриях. Истощение АТФ ведет к клеточным изменениям, включая отек, утрату нормальной целостности клеток и утрату полярности мембран. Клеточные изменения вызывают летальную фазу ишемии, приводящую к накоплению метаболических отходов, активации протеаз и гибели клеток.

Современные перфузионные растворы, представляющие настоящее положение дел в вопросе гипотермической консервации органов, и поставляемые для оптимальной консервации органов в условиях гипотермии, содержат компоненты, которые предотвращают отек тканей, индуцированный гипотермией; метаболиты, которые облегчают функционирование органа после пересадки; антиоксиданты; стабилизаторы мембран; коллоиды, ионы и соли (Southard et al., 1990, Transpl. 49:251; и Southard, 1989, Transpl. Proc. 21:1195). Состав этого перфузионного раствора таков, что он сохраняет органы путем гипотермически индуцированного подавления метаболизма. В то время как он сводит к минимуму отек и вазоспазм, обычно наблюдающиеся при гипотермическом хранении, он не предназначен для использования при значительно расширенном донорском пуле.

Это обусловлено тем, что орган или ткань, сильно поврежденные теплой ишемией, но функционально еще сохраненные, не могут перенести дальнейшего повреждения при гипотермии. Даже если ишемия длилась всего 30 минут, функция органа после пересадки может оказаться скомпрометированной. Например, при использовании органов, взятых от трупов с работавшим сердцем, частота нефункционирования органов сразу после пересадки составляет около 25%, а после 30 минут ишемии - возрастает приблизительно до 60%. Следовательно, 60% почек, взятых от трупов с неработавшим сердцем, не начинают сразу работать вследствие прелетального ишемического повреждения. Помимо этого, полагают, что в органах, лишенных кровотока на несколько часов и менее, наблюдается необратимое ишемическое повреждение (Klutz et al., патент США 5395314). Пока не будут

R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2
R U

RU 2199310 C2

разработаны новые источники органов для пересадки, количество операций по трансплантации будет оставаться постоянным. Помимо этого, донорский пул не может быть достаточно расширен, поскольку не существует способа и системы для восстановления прелетального ишемического повреждения в органах или тканях, поврежденных теплой ишемией.

Недавние попытки фокусировались на предупреждении ишемического повреждения путем оживления органов реперфузией раствором немедленно после прекращения кровоснабжения. Например, защитный раствор, описанный в патенте США 4415556, используется при хирургических операциях или для органов, предназначенных для трансплантации, с целью предупреждения ишемического повреждения органа. Этот защитный раствор используется в качестве перфузионного для улучшения аэробного обмена при перфузии органа. Патент США 5395314 описывает способ оживления мозга путем циркуляции, после прекращения кровоснабжения, через мозг гипотермического консервирующего раствора (около 8-10°C), составленного таким образом, чтобы понижать метаболизм в органе, доставлять кислород и ингибиовать свободнорадикальное повреждение.

Несмотря на то, что эти способы и консервирующие растворы пригодны для предупреждения ишемического повреждения органов, эти выгодные стороны затеняются практическими и функциональными недостатками. Во-первых, для того, чтобы эти способы и растворы были эффективны для предотвращения ишемического повреждения, они должны применяться немедленно (в течение минут) после прекращения кровоснабжения. Материально-технические проблемы, например, в случае, когда донором органа является жертва несчастного случая, могут сильно ограничивать применение таких способов и растворов, которые практичны только в условиях стационаров. Во-вторых, как полагают, необратимое ишемическое повреждение наблюдается в органах, лишенных кровоснабжения, в течение минут (например, в мозгу) или в течение нескольких часов (в сердце, почке). Орган или ткань, сильно поврежденные теплой ишемией, но функционально еще сохранные, не могут перенести дальнейшего повреждения при гипотермическом хранении перед трансплантацией или возобновления кровотока после трансплантации. Одной причиной является то, что восстановление кровообращения после ишемии-реперфузии парадоксальным образом может приводить к дальнейшему повреждению ткани (McCord et al., 1985, N Engl. J. Med. 312:159-163). Восстановление кровообращения вызывает реоксигенацию поврежденной ткани. Реоксигенация ишемически поврежденной ткани может привести к дальнейшему повреждению ткани вследствие образования радикалов свободного кислорода, истощения поглотителей свободных радикалов и высвобождения хемотактических агентов.

Таким образом, существует потребность в способе и растворе, которые могли бы преодолеть, а не только ингибиовать, эффекты ишемии в органах или тканях во время прелетальной фазы, способствовать

восстановительным процессам в органах или тканях на очень ранних стадиях летальной ишемии. Способ индуцирования восстановления ишемически поврежденных органов или тканей до такой степени, при которой нарушение функции может стать обратимым, при этом предотвращение дальнейшего повреждения ткани во время возобновления кровотока может привести к существенному расширению донорского пула.

Краткое описание существа изобретения

Настоящее изобретение направлено на то,

что вплоть до времени появления настоящего изобретения считалось необратимым ишемическим повреждением органов или тканей, лишенных кровоснабжения. Способ и композиции используются после

ишемического повреждения для

индуцирования восстановления ишемически поврежденных органов или тканей, а также предотвращения дальнейшего повреждения ткани во время возобновления кровотока. Это

отличает способ и композиции настоящего изобретения от применяющихся в настоящее время способов и композиций, предназначенных для использования до ишемического повреждения, с целью предотвращения или ингибирования такого повреждения. Способ настоящего изобретения является способом, с помощью

которого можно восстановить целостность и функцию ишемически поврежденного органа или ткани во время, по крайней мере, прелетальной фазы ишемии, применения восстановительный раствор по настоящему изобретению. Далее, способ и раствор настоящего изобретения предназначены для

предотвращения или ингибирования дальнейшего повреждения ткани, которое может наблюдаться при возобновлении кровотока в органе или ткани, лишенных кровоснабжения.

Способ настоящего изобретения включает промывание органа через артериальную систему восстановительным раствором настоящего изобретения в условиях высокой температуры, приблизительно от 28°C до

37 °C, для удаления крови и ацидотических продуктов, которые накопились в органе или ткани во время периода отсутствия кровотока; и перфузию промытого органа или ткани восстановительным раствором с целью (1)

расширить кровеносные сосуды, особенно спазмированные микрососуды в органе или ткани; (2) восстановить функцию органа или ткани путем снабжения их трофическими факторами; (3) восстановить целостность и

функцию клеток в ишемически поврежденном органе или ткани и (4) восстановить окислительный метаболизм путем реадаптации ишемически поврежденного органа или ткани, выживаяющих с помощью

анаэробного дыхания, к оксигенированному восстановительному раствору; что делает орган или ткань пригодными для трансплантации и/или для восстановления

циркуляции крови.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет блок-схему, показывающую процессы в органе, на которые действует восстановительный процесс и раствор по настоящему изобретению.

Фиг.2 представляет график зависимости параметра функции органа (сывороточный

RU 2199310C2

кеатинин) от числа дней, прошедших после трансплантации, при аллотрансплантации у собаки, при использовании способа и восстановительного раствора по настоящему изобретению.

Фиг.3 представляет график зависимости параметра функции органа (кеатинин мочи) от числа дней, прошедших после трансплантации, при аллотрансплантации у собаки, при использовании способа и восстановительного раствора по настоящему изобретению.

Фиг.4 представляет график зависимости параметра функции органа (сырьевойочный креатинин) от числа дней, прошедших после трансплантации, при аутотрансплантации у собаки, при использовании способа и восстановительного раствора по настоящему изобретению.

Фиг.5 представляет график зависимости параметра функции органа (кеатинин мочи) от числа дней, прошедших после трансплантации, при аутотрансплантации у собаки, при использовании способа и восстановительного раствора по настоящему изобретению.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

Определения

"Лишенный кровотока" здесь является термином, применяемым для целей описания и формулы изобретения, который относится к прекращению циркуляции крови через орган или ткань при любых обстоятельствах, в которых может быть прекращена циркуляция крови и появляется теплая ишемия. Эти обстоятельства включают прекращение сердечных сокращений для хирургических процедур или в силу естественных причин, таких как сердечный приступ.

"Орган или ткань" здесь является термином, применяемым для целей описания и формулы изобретения, который относится к почке, сердцу, печени, легкому, тонкой кишке, поджелудочной железе, мозгу, глазу и коже, но не ограничивается ими.

"Восстановительный раствор" здесь является термином, применяемым для целей описания и формулы изобретения, который относится к буферному физиологическому раствору, обеспечивающему средства для восстановления целостности и функции ишемически поврежденных органов, лишенных кровотока, а также для предотвращения или ингибиования дальнейшего повреждения тканей, которые могут наблюдаться при восстановлении циркуляции крови через орган, лишенный кровотока.

Способ настоящего изобретения является способом, посредством которого могут быть восстановлены целостность и функция ишемически поврежденного органа, по меньшей мере, во время фазы прелептальной ишемии, с использованием восстановительного раствора настоящего изобретения. Восстановление целостности и функции органов с помощью способа и композиций настоящего изобретения было неожиданным, поскольку к времени создания этого изобретения предполагалось, что ишемическое повреждение органов, лишенных кровотока в течение всего нескольких часов или менее, необратимо. Помимо этого, способ и раствор настоящего

изобретения предназначены для предотвращения или ингибирования дальнейшего повреждения тканей, которое может наблюдаться во время восстановления циркуляции крови в органе, лишенном кровотока.

Способ и раствор настоящего изобретения обеспечивают средства для удаления крови и ацидотических продуктов, накопившихся во время периода прекращения кровотока в органе; средства для восстановления клеточной целостности и функции, восстанавливая, таким образом, функцию органа; и средства для реадаптации органа к оксигенированной среде. Способность восстанавливать функцию органа после ишемического повреждения сочтена возможной, исходя из следующих предпосылок: (1) кровь не свертывается, находясь в контакте с жизнеспособными васкулярными эндотелиальными клетками и, следовательно, ишемически поврежденные органы можно реперфузировать, обеспечивая жизнеспособность и интактность этого эндотелия; (2) восстановление сосудистой динамики зависит от обеспечения адекватной вазодилатации, зависящей от

эндотелиальных клеток, с целью адекватной перфузии и оксигенации ткани и обеспечения нормальных механизмов саморегуляции; (3) микрососуды для их оживления должны быть адекватно расширены, но нормальная их проницаемость не должна изменяться, чтобы можно было восстановить клеточную целостность; и (4) трофические факторы, утраченные во время ишемии, должны быть восполнены, а полярность клеток, необходимая для нормального функционирования, должна быть

восстановлена.

Способ и раствор настоящего изобретения действуют совместно для оживления ишемически поврежденного органа с целью восстановления функции органа и реадаптации органа к оксигенированной среде. Фиг.1 представляет блок-схему, показывающую процессы в органе, на которые действует восстановительный процесс и раствор по настоящему изобретению.

Следующие примеры иллюстрируют предпочтительные варианты практического осуществления настоящего изобретения. В следующих вариантах осуществления, используемых для иллюстрации, важно учитывать следующие соображения. Модель на теленке и модель на собаке были задействованы для оценки композиций и методов, относящихся к трансплантации органов, предназначенных для человека, поскольку было показано, что эти модели отражают физиологическую основу. Таким образом, хотя композиция и способ настоящего изобретения оценивались на этих экспериментальных моделях, эта композиция и способ должны использоваться прежде всего для человека. Физиологическая основа для экстраполяции данных от экспериментальных моделей на человека хорошо известна специалистам, и включает учет различий, таких как объемы органов и размеры кровотока через органы (см., например, Harrison et al., 1977, J. Pharm. Sci. 66:1679-1683). Следует понимать, что эти примеры предназначены для

RU 2199310 C2

илюстрации, а не для ограничений.

Пример 1 - Способ

Способ настоящего изобретения включает помочь в период отсутствия кровообращения в органе до того, как наступит значительная гибель клеток. Специалисту будет понятно, что этот период, в течение которого можно применять указанный способ, различен в зависимости от типа обрабатываемого органа. Например, промежуток времени, в течение которого обрабатывается сердце с помощью способа настоящего изобретения, может быть менее приблизительно одного часа; в то время как почку можно обрабатывать с помощью способа настоящего изобретения в течение приблизительно до 4 часов отсутствия кровотока. Чтобы остановить каскад ишемического повреждения, ведущий к гибели клеток, способом, показанным на фиг.1, способ настоящего изобретения включает стадии:

(i) промывания ишемически поврежденного органа через артериальную систему восстановительным раствором настоящего изобретения в условиях высокой температуры, приблизительно от 28°C до 37 °C, для (i) удаления крови и ацидотических продуктов, которые накопились в органе во время периода отсутствия кровотока;

(ii) восстановления клеточной среды до физиологических значений pH;

(iii) адекватного расширения микрососудов;

(iv) поддержания продолжающегося анаэробного метаболизма как спасательного процесса путем обеспечения высоконергетическими соединениями и поддержания гликолиза с помощью дополнительных субстратов, которые могут включать глюкозу, пируват и уридин-5'-трифосфат (УТФ), но не ограничиваются ими;

(v) инициирования перехода от анаэробного метаболизма к окислительному метаболизму путем обеспечения метаболическими субстратами для восполнения пула адениновых соединений, поддержания цикла лимонной кислоты и восстановления системы транспорта электронных пар, в то время как молекулярный кислород вводится медленно, чтобы избежать реинфарционного повреждения, опосредуемого токсичностью кислорода;

(vi) создания механизма для адекватной вазодилатации микросудистого ложа эндотелиальных клеток внутри сильно спазмированного, отечного, ишемически поврежденного органа, без значительного изменения проницаемости органа; причем эта вазодилатация делает возможной адекватную перфузию ткани органа, что создает стабильное давление перфузии, стабильную скорость тока жидкости и постоянную температуру, постоянную величину pH и постоянную оксигенацию;

(vii) обеспечения трофическими факторами для восстановления функции ишемически поврежденного органа, обеспечивая таким образом, метаболиты для восстановления клеточной целостности и функции; и

2) перфузии ишемически поврежденного

органа через артериальную систему восстановительным раствором настоящего изобретения в условиях высокой температуры, приблизительно от 28°C до 37 °C, для

(i) нормализации оксигенирования, температуры и pH;

(ii) продолжения обеспечения механизма для адекватного расширения сосудистого русла органа, без существенного изменения проницаемости органа, обеспечивая, таким образом, стабильное давление перфузии и стабильную скорость тока жидкости; и

(iii) продолжения обеспечения

тrophicескими факторами для восстановления функции ишемически поврежденного органа, обеспечивая, таким образом, метаболиты для восстановления клеточной целостности и функции, такого как упрочнение межклеточных соединений и восстановление полярности мембран.

Специалисту будет понятно, что один или более благоприятных эффектов, достигнутых на этапе промывания, будут продолжаться также на этапе перфузии, поскольку восстановительный раствор настоящего изобретения можно использовать на протяжении всего процесса, т.е., включая стадии промывания и перфузии.

Для целей иллюстрации, но не ограничения, на стадии промывания достаточное количество восстановительного раствора медленно вводят вливанием через катетер в главную для данного конкретного органа артерию до тех пор, пока вытекающая жидкость не будет больше содержать крови.

Этим способом ишемическая кровь и ацидотические продукты, которые накопились в сосудах за период времени, в течение которого орган был лишен кровоснабжения, удаляются из сосудов. Далее, восстанавливается pH и доставляется свежий субстрат для поддержания анаэробного метаболизма и других путей обмена в клетке, необходимых для клеточной целостности и функции. Специалисту будет ясно, что количество восстановительного раствора, достаточное для промывания, может зависеть от конкретного вида и размеров органа, который промывают, а также от продолжительности периода времени, в течение которого отсутствовало кровоснабжение. Для иллюстрации, но не для ограничения, от 200 до 600 мл восстановительного раствора может быть достаточным для промывания почки человека, в которой отсутствовал кровоток в течение 1-3 часов.

Для целей иллюстрации, но не ограничения, на этапе перфузии достаточное количество восстановительного раствора медленно перфузируют при систолическом давлении, подходящем для ишемически поврежденного органа, который оживляют, до тех пор, пока не достигают скорости тока жидкости, которая является приблизительно нормальной для этого конкретного типа органа. Для иллюстрации, но не для ограничения, почку человека, в которой отсутствовал кровоток в течение 1-3 часов, можно медленно перфузировать восстановительным раствором при систолическом давлении <80 мм рт.ст., до тех пор, пока скорость тока жидкости не достигнет >50 мл/мин. pH нормализуется до

R U
2 1 9 9 3 1 0
C 2

физиологических пределов путем медленного введения молекулярного кислорода через оксигенатор или через вещество, транспортирующее кислород, являющееся составной частью восстановительного раствора. Оксигенация органа во время перфузии, а также нормализация температуры и pH, наблюдается приблизительно в течение первых 15-30 минут перфузии. Поскольку сосуды органа медленно расширяются, давление перфузии и скорость тока жидкости начинают стабилизироваться, и орган быстро переключается на окислительный метаболизм. Специалисту будет понятно, что продолжительность времени, необходимого для перфузии, зависит от конкретного типа и размеров перфузируемого органа, а также от продолжительности периода отсутствия кровообращения. Однако обработка ишемически поврежденного органа с помощью способа настоящего изобретения (промывания и перфузии) приблизительно в течение 2 часов может быть достаточной при оживлении большинства органов (например, лишенных кровотока в течение периода времени от 0,5 до 4 часов) для восстановления их функции. Также, если орган вырабатывает какой-то продукт, как, например, почка вырабатывает мочу, этот способ может приводить к появлению выработки продуктов нормальной деятельности органа.

Способ настоящего изобретения был разработан для консервации и оживления ишемически поврежденных органов *ex vivo* без использования традиционной гипотермии (4-10°C). Этот способ обеспечивает необходимую доставку кислорода, питательные вещества для метаболизма, онкотическое давление, pH, перфузионное давление и скорость тока жидкости для поддержания метаболизма органа *ex vivo* чаще всего в пределах соответствующих нормальных значений этих величин *in vivo* или около того. Почти нормальная скорость метаболизма здесь определяется как приблизительно 70-90% нормальной скорости метаболизма. Далее, способ настоящего изобретения поддерживает такой уровень метаболизма *ex vivo*, который обеспечивает окислительный метаболизм, достаточный для выработки нормального функционального продукта этого органа. Разработка этого способа, который поддерживает органы *ex vivo* без традиционной гипотермии, предоставляет возможность поддерживать почти нормальную скорость метаболизма и устанавливать функциональные возможности, которые могут быть соотнесены с постоперационным или посттрансплантионным течением.

В еще одном варианте осуществления способа настоящего изобретения можно осуществлять с помощью устройства, включающего ламинарную или пульсирующую насосную систему для доставки восстановительного раствора, включая средства для обеспечения и контроля перфузии и перфузионного давления; средства для контроля температуры и средства для обеспечения и контроля введения и выведения дыхательных газов. Подобное устройство описано автором настоящего изобретения в патентной заявке

США 08/246801, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки. Такое устройство может также включать средства для тестирования и/или сбора перфузата, который уже прошел через орган к монитору, и измерения одной или более функциональных характеристик, таких как pH, различные виды давления, скорость тока жидкости, сосудистое сопротивление, различные химические составляющие, оксигенация, концентрация диоксида углерода и потребление кислорода. Помимо этого, можно использовать еще одно устройство или второе устройство в соединении с первым, для определения и/или сбора продукта, вырабатываемого органом, такого как моча, вырабатываемая почкой; причем последующее определение параметров этого продукта, вырабатываемого органом, может соотноситься с целостностью и функцией органа во время или после применения способа настоящего изобретения.

Пример 2 - Восстановительный раствор Растворы для консервации и перфузии органа известны как растворы, включающие основной раствор, который состоит из буферного физиологического раствора, такого как солевой раствор или основная среда, подобная среда для культуры клеток, к которому добавляют разнообразные дополнительные вещества. В предпочтительном варианте осуществления восстановительный раствор настоящего изобретения также включает подобный основной раствор, содержащий аминокислоты, ионы, физиологические соли, непроникающие вещества, сывороточные белки и/или факторы и сахара. Помимо компонентов основного раствора, восстановительный раствор настоящего изобретения содержит новую комбинацию дополнительных веществ, которые могут быть сгруппированы по меньшей мере в 3 категории компонентов. Специалисту будет понятно, что компоненты каждой категории могут заменяться функционально эквивалентным соединением для достижения того же самого результата. Таким образом, следующие перечисленные виды компонентов каждой категории компонентов служат целям иллюстрации, но не ограничения.

Первая категория компонентов, вазодилататоры, включает комбинацию компонентов в физиологически эффективных количествах, которые обеспечивают средство для адекватного расширения крупных сосудов через клеточное расслабление гладкой мускулатуры сосудов, а также для адекватного расширения микрососудов. Для того, чтобы гарантировать нормальную проницаемость сосудистого русла, вазодилатацию контролируют в условиях зависимости от эндотелиальных клеток. Такая комбинация компонентов может включать (1) субстраты для вазодилатации, опосредуемой эндотелиальными клетками, такие как ацетилхолин, допамин, брадикинин и аргинин; (2) субстраты для расширения микрососудов, такие как простагландин (и аналоги, например, карбапиклин) и Mg⁺; и (3) аденоzin (и аналоги, например, циклогексиладеноzin), и верапамил для их объединенного действия на расширение сосудов, опосредуемого

? 1 9 9 3 1 0 C 2

R U

RU
2199310
C2

блокированием кальциевых каналов (другие блокаторы кальциевых каналов включают флунаризин, нифедипин, SNX-11, хлорпромазин и дилтиазем). Результатом применения такой комбинации вазодилататоров является то, что сосудистое русло хорошо расширяется, одновременно сохраняя свою целостность и нормальную барьерную функцию. Вазодилататоры составляют приблизительно от 1 до 50% (масса/объем) от объема новой комбинации дополнительных веществ, которую добавляют к основному раствору при составлении восстановительного раствора настоящего изобретения.

Вторая категория компонентов, химические энергетические субстраты, включают комбинацию компонентов в физиологически эффективных количествах, которые обеспечивают средство для восстановления окислительного метаболизма, утраченного в течение периода отсутствия кровотока. Во время периода отсутствия кровотока возникающая утрата целостности мембранных приводит к потере внутриклеточных компонентов, таких как ионы, компоненты пула адениновых соединений, цикла лимонной кислоты и цепочки транспорта электронных пар. Такие химические энергетические субстраты, добавляемые в восстановительный раствор, могут включать пируват, глюкозу, АТФ, АМФ, кофермент

А, β-никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺, β-никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ⁺), флавинадениндинуклеотид (ФАД), тиаминпирофосфат хлорид (хокарбоксилазу), уридин-5'-трифосфат (УТФ), хлорид, аденоzin, магний и их комбинации. Если снабжение энергией в клетках тканей восстановлено до гибели клеток, клеточные изменения, возникшие в период отсутствия кровотока, могут стать обратимыми, а клеточный объем ткани возвращается к норме. Химические энергетические субстраты составляют приблизительно от 0,01 до 90% от объема новой комбинации дополнительных веществ, которую добавляют к основному раствору при составлении восстановительного раствора настоящего изобретения.

Третья категория компонентов, трофические факторы, включает комбинацию компонентов в физиологически эффективных количествах, которые обеспечивают средство для ускорения одного или более восстановительных процессов в клетках, с целью восстановления клеточной функции, утраченной в период отсутствия кровотока. Эта комбинация трофических факторов обеспечивает средство для ускорения синтеза белка, что приводит к восстановлению плотных межклеточных соединений и к регенерации полярности мембранных, восстанавливая, таким образом, функцию клеток. Такие трофические факторы, добавляемые в восстановительный раствор, могут включать высокие концентрации аминокислот и магния (например, в 2-6 раз больше обычных концентраций в плазме), производные нуклеиновых кислот и рибонуклеозиды; а также факторы роста с потенциаторами мембранных, такие как кислый

фактор роста фибробластов (ФРФ), основной ФРФ, гепарин и хондроитинсульфат, и их комбинации. Эти трофические факторы составляют приблизительно от 1 до 90% от объема новой комбинации дополнительных веществ, которую добавляют и растворяют в основном растворе при составлении восстановительного раствора настоящего изобретения.

Специалисту будет понятно, что компоненты из одной или более упомянутых категорий могут нести дополнительные функции, желательные для способа настоящего изобретения. Например, ионы магния (введенные в состав как часть соединения, содержащего магний) действуют и как вазодилататор, и как химический энергетический субстрат; а глюкоза действует и как трофический фактор, и как химический энергетический субстрат. Помимо этого, в предпочтительном варианте осуществления аминокислоты, содержащиеся в восстановительном растворе, включают цистин и цистein в количествах, которые, помимо функционирования в качестве трофических факторов, также действуют как антиоксиданты - избирательные поглотители свободных радикалов, которые поглощают токсичные свободные радикалы во время стадий промывания и перфузии настоящего способа. Другие антиоксиданты, такие как глутатион, циклодекстрин, супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, хлорпромазин и простациклин, также могут включаться, или использоваться как функционально эквивалентные соединения в восстановительном растворе настоящего изобретения. Эти антиоксиданты составляют приблизительно от 0,000% до 10% от объема новой комбинации дополнительных веществ, которую добавляют и растворяют в основном растворе при составлении восстановительного раствора настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, при котором тканью, которую нужно оживлять с помощью восстановительного раствора настоящего изобретения, является нервная ткань (например, головной мозг), восстановительный раствор может дополнительно включать нейропротекторы, такие как агенты, блокирующие рецепторы NMDA (блокаторы ионных каналов рецепторов NMDA, например, Аптиганел и Церестат; блокаторы глициновых участков рецепторов NMDA, например, ZD 9379 и GV 150-562A), блокаторы аккумуляции оксида азота (NO) (например, лубелузол) и блокаторы натриевых каналов для ингибирования притока натрия в клетки, что может инициировать высвобождение глутамата (например, BW619-C89, фосфенитоин).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, помимо введения молекулярного кислорода через оксигенатор, восстановительный раствор содержит одно или более переносящих кислород соединений ("переносящие кислород агенты"), которые поставляют молекулярный кислород для окислительного метаболизма в ишемически поврежденный орган. Такие несущие кислород агенты известны специалистам и включают гемоглобин, стабилизированные

RU
2199310
C2

производные гемоглобина (изготовленные из гемолизированных эритроцитов человека, такие как пиридоксилированный гемоглобин), полиоксэтиленовые конъюгаты (PHP), рекомбинантные гемоглобиновые продукты, перфторхимические (ПФХ) эмульсии и/или перфторхимические микропузьрики (здесь общее название "перфторхимические агенты"), но не ограничиваются ими. Эти переносящие кислород агенты составляют приблизительно от 0,000% до 50% от объема новой комбинации дополнительных веществ, которую добавляют и растворяют в основном растворе при составлении восстановительного раствора настоящего изобретения; или приблизительно от 0,000% до 20% от общего объема восстановительного раствора (об./об.).

Эмульсии ПФХ, пригодные в качестве переносящих кислород агентов, описаны, например, в патентах США 5403575, 4868318, 4866096, 4865836, 4686024, 4534978, 4443480, 4423077, 4252827, 4187252, 4186253, 4110474 и 3962439. Такие жидкие эмульсии ПФХ включают перфтороктилбромид, перфтороктилдибромид, бромфторуглероды, перфторэфиры, Fluosol DATM, F-44E, 1,2-бисперфторбутилэтилен, F-4-метилоктагидрохинолидизин, перфторамины от 9 до 12 атомов углерода, перфтордекалин, перфториндан, перфторトリメチルビциクロ[3.3.1]октан, перфторметиладамант, перфтордиметиладамантан, но не ограничиваются ими. Микропузырьки ПФХ, пригодные в качестве переносящих кислород агентов, описаны, например, в патентах США 5409688 и 5393524. Агенты ПФХ, которые описаны как пригодные для создания таких микропузырьков, включают, но не ограничиваются ими, додекафтортрентан (ДДФГ), гексафтторид серы, пентан, гексафтторпропилен, октафтторпропан, гексафтторэтан, октафттор-2-бутин, гексафтторбутил-1,3-диен, изопрен, октафтторцикlobутан, декафтторбутан, цис-2-пентен, диметилсульфид, этиларсин, бромхлорфторметан, транс-2-пентен, 2-хлорпропан, гексафттордисульфид, этилмеркаптан, диэтиловый эфир, этилвиниловый эфир, валилен, трисфтторарсин, фурфурилбромид, цис-пропенилхлорид, бутилфтторид, 1,1-дихлорэтан, изопропилметиловый эфир, изопропиламин, метилформиат, 2-ацетилфuran, этиленфтторид, 1-пентен, изопропилацетилен, перфторпентан, изопентан, виниловый эфир, 2-бутин, 1,4-пентадиен, тетраметилсилан, диметилфосфин, дигромидфторметан, 2-хлорпропен, дифториодметан, ацеталдегид, триметилбор, 3-метил-2-бутен, 1,1-диметилицлопропан, аминоэтан, винилбромид, дисиланометан, трихлорфторметан, бромфторметан, трифттордихлорэтан, перфторпентан и другие фторсодержащие углеводороды (патент США 5409688).

В процессе изготовления восстановительного раствора настоящего изобретения к основному раствору добавляют и растворяют в нем новую комбинацию дополнительных веществ, которые можно разделить на 3 категории, включая

вазодилататоры, химические энергетические субстраты и трофические факторы. Несмотря на то, что композиция восстановительного раствора для использования в способе настоящего изобретения может меняться по содержанию компонентов и их количеству, как описано выше, предпочтительный состав приводится в таблице 1 для целей иллюстрации, но не ограничения (заметьте, что для ясности компонент, который может функционировать в более чем одной из по меньшей мере трех категориях, помещен в одну категорию, внизу).

Приготовленный таким образом восстановительный раствор должен иметь осмолярность >330 мОсм, но предпочтительно, менее 600 мОсм, и в предпочтительном диапазоне приблизительно от 350 мОсм до 400 мОсм. pH восстановительного раствора следует довести до пределов приблизительно от 6,5 до 7,5, и предпочтительно, от 7,3 до 7,45.

20 Как указывалось, в другом варианте осуществления восстановительный раствор может также включать дополнительные антиоксиданты и один или более переносящих кислород агентов, следующим образом (на литр основного раствора):

25 Антиоксиданты - Количество
 Глутатион - 0,1 мг
 Циклодекстрин - 500 мг
 Переносящий кислород агент
 перфторхимический агент - 20 об.%

30 Пример 3 - Эффект прекращения кровотока

Были проведены эксперименты,

показывающие влияние теплой ишемии, вызванной прекращением кровотока в орган приблизительно на 30 минут. Такая теплая ишемия приводит к быстрому нарушению целостности клеток. Каскад ишемического повреждения начинается с утраты пупа гемомицелия, то есть гибели клеток, и

адениновых соединений, что приводит к отеку. Потеря целостности клеток и появление стека приводят к сосудистому коллапсу и нарушению нормальной проницаемости сосудов. Можно видеть, что в органе, таком как почка, ишемическое повреждение, вызванное прекращением кровотока в почке всего на 30 минут, вызывает сильный спазм сосудов. Этот

выраженный сосудистый спазм так изменяет скорость тока жидкости, что она становится недостаточной для адекватной перфузии почки. Высокое сосудистое сопротивление в спазмированных сосудах приводит к дальнейшему ухудшению вторичной гипоксии и тем самым к потере функциональных возможностей (т. е. к прогрессии выработки

возможностей (т.е., к прекращению выработки мочи). Таблица 2 иллюстрирует сравнение перфузионных характеристик (давление, скорость тока жидкости и сосудистое сопротивление) и функции органа (выработка мочи) на экспериментальных животных моделях, включая почки теленка, в которых кровоток не прекращался ("нормальные") и включая почки теленка, в которых кровоток прекращали всего на 30 минут ("ишемические"). Сосудистое сопротивление представляет среднее давление/средняя скорость тока жидкости.

Пример 4 - Эффекты способа оживления и восстановительного раствора.

Были проведены эксперименты с целью продемонстрировать способность способа

R
U
2
1
9
9
3
1
0
C
2

оживления и восстановительного раствора настоящего изобретения преодолевать, а не только ингибировать, эффекты теплой ишемии в органах, и поддерживать процесс восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление нарушенной функции органа. Почки изымали у умерщвленных телят крупного рогатого скота. После 30 или 60 минут отсутствия кровотока почки удаляли срединным разрезом. До удаления почек не предпринимали никакого воздействия, в том числе, введения антикоагулянтов. Каждая контрольная почка лишалась кровотока на 30 минут, подвергаясь, таким образом, в этот период ишемическому повреждению. После удаления контрольные почки промывали 100 см³ основной среды для культур клеток при температуре 32°C, так, что почки отмывали от крови, оставшейся в сосудистом русле. Каждая экспериментальная почка лишалась кровотока на 60 минут, подвергаясь, таким образом, в этот период ишемическому повреждению. После удаления экспериментальные почки промывали 100 см³ восстановительного раствора настоящего изобретения при температуре 32 °C. После промывания через эти почки прокачивали с помощью модифицированной системы для консервации органов во время транспортировки MOX-100™. Контрольные почки прокачивали при 32°C используя ранее известные методики для консервации органов с помощью технологии теплой консервации, используя в качестве перфузионного раствора основную среду для культур клеток. Экспериментальные почки прокачивали, используя способ и восстановительный раствор настоящего изобретения, при 32 °C. Сравнение перфузионных характеристик (давление, скорость тока жидкости и сосудистое сопротивление) и функции органа (выработка мочи) в контрольной группе (30 минут ишемии) и в экспериментальной группе (60 минут ишемии) показано в таблице 3.

Экспериментальные почки, подвергавшиеся ишемическому повреждению в течение одного часа, которые затем оживляли с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, демонстрировали перфузионные характеристики (давление, скорость тока жидкости и сосудистое сопротивление) и функцию органа (выработка мочи) в функциональных пределах нормальных почек, представленных в таблице 2. Таким образом, показана способность способа и восстановительного раствора настоящего изобретения преодолевать, а не только ингибировать, эффекты теплой ишемии в органах, и поддерживать процесс восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление функции органа.

Пример 5 - Эффективность при разной продолжительности периода повреждения

Были проведены эксперименты с целью оценить эффекты способа и восстановительного раствора настоящего изобретения в органах, которые были лишены кровотока на периоды времени более 1 часа. Почки изымали у умерщвленных телят крупного рогатого скота через различные периоды времени отсутствия кровотока,

включая 60 минут, 90 минут, 2 часа или 4 часа. До удаления почек не предпринимали никакого воздействия, в том числе, введение антикоагулянтов. Каждую почку затем промывали 100 см³ восстановительного раствора настоящего изобретения при температуре 32°C. Ни разу, ни в одной почке не обнаруживали свернувшейся крови в сосудистом русле. Кровь появлялась в оставшейся жидкости, поскольку она находилась в контакте с жизнеспособным эндотелием кровеносных сосудов. После промывания эти почки прокачивали в течение нескольких часов, используя способ и восстановительный раствор настоящего изобретения, при 30 °C. Сравнение средних перфузионных характеристик (давление, скорость тока жидкости и сосудистое сопротивление) и функции органа (концентрация креатинина в моче - клиренс креатинина; гистология) в почках, лишенных кровотока на 60 минут (60'), в почках, лишенных кровотока на 90 минут (90'), в почках, лишенных кровотока на 2 часа (120') и в почках, лишенных кровотока на 4 часа (240') показано в таблице 4.

Результаты свидетельствуют о том, что способ и восстановительный раствор настоящего изобретения могут оживлять ишемически поврежденный орган, лишенный кровотока на период по меньшей мере до 4 часов. Например, когда почку, перенесшую теплое ишемическое повреждение в течение 60 минут, прокачивают в течение 2 часов, используя способ и восстановительный раствор настоящего изобретения, перфузионные характеристики эквивалентны тем, которые наблюдаются в нормальной почке, как представлено в таблице 1. Гистологические оценки подтверждают функциональные данные, так как исследованные срезы тканей показали, что морфология и целостность хорошо сохранились.

При лишении кровотока на 90 и 120 минут состояние почек отражало более обширные клеточные повреждения (т.е., повышенное диастолическое давление и сниженные скорости тока жидкости) по сравнению с почками, лишенными кровотока на 60 минут. Тем не менее, несмотря на такие повреждения клеток, эти почки все же вырабатывали мочу, а гистологически они представлялись хорошо сохранившимися. Помимо этого в этих почках не было обнаружено некроза.

В почках, лишенных кровотока на 4 часа, наблюдались значительно сниженные скорости тока жидкости, а также сопутствующее повышение диастолического давления, которое включает спазм сосудистого ложа. Однако, важно отметить, что эти почки все еще функционировали. Моча вырабатывалась с содержанием креатинина 23,5 мг/дл. Гистологически в этих почках наблюдались первые признаки точечного раннего некроза. По соседству с очагами точечного тубулярного некроза наблюдались признаки митотической активности, указывающие на начало активного восстановительного процесса. Таким образом, даже после 4 часов лишения кровотока была показана способность способа и восстановительного раствора

R
U
2
1
9
9
3
1
0
C
2

настоящего изобретения преодолевать, а не только ингибирировать, действие теплой ишемии на органы, и поддерживать процесс восстановления до такой степени, при которой нарушение функции может стать обратимым.

Важно отметить, что контрольные почки (без обработки с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения) оценивали гистологически через 2 или 4 часа отсутствия кровотока с целью определить относительные преимущества этого способа и восстановительного раствора. Гистологическая оценка контрольных почек, подвергшихся 2-часовой теплой ишемии, показала ранний диффузный тубулярный некроз. После 4-часовой теплой ишемии в контрольных почках наблюдалось диффузное разрушение клеток канальцев. Напротив, в почках, подвергшихся 2-часовой теплой ишемии, а затем обработанных с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, наблюдалось восстановление целостности клеток. Далее, в почках, подвергшихся 4-часовой теплой ишемии, а затем обработанных с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, наблюдался только точечный тубулярный некроз, по сравнению с распространенным повреждением канальцев в контрольных почках. Гистологическая оценка впоследствии подтвердила значительную эффективность способа и восстановительного раствора настоящего изобретения в отношении реверсии каскада процессов теплой ишемии после лишения кровотока.

Пример 6 - Функция реанимированного органа *in vivo*

A. Аллотрансплантация

Орган, реанимированный с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, оценивали на функцию *in vivo* после оживления. Была выполнена аллотрансплантация собаке; почку брали у собаки-донора спустя 60 минут после посмертной остановки кровообращения; промывали орган восстановительным раствором настоящего изобретения; и перфузировали его в течение 2 часов, используя способ и восстановительный раствор настоящего изобретения, при температуре 30-32°C. После процесса оживления почку затем пересаживали собаке-реципиенту с одновременной билатеральной нефрэктомией почек реципиента. Таким образом, выживание собаки-реципиента зависело от реанимированной почки. Течение посттрансплантационного периода у собаки-реципиента показано на фиг.2 и 3.

Почка хорошо реперфузировалась и вырабатывала мочу через два часа после пересадки. Почка продолжала вырабатывать мочу в течение всего периода посттрансплантационного наблюдения. Как показано на фиг.2, у реципиента наблюдался небольшой подъем сывороточного креатинина до уровня выше 2 мг/дл через 24 часа после пересадки. Уровень сывороточного креатинина возвратился к нормальным значениям через 48 часов после пересадки. Биохимические показатели сыворотки оставались нормальными до

десятого дня после пересадки, когда произошло острое отторжение пересаженного органа (собака-реципиент получала недостаточную иммуносупрессивную терапию). Как показано на фиг.3, уровень креатинина в моче быстро возрастал и достигал нормальных пределов около 70 мг/дл через 48 часов после пересадки. Этот очень незначительный эпизод острого тубулярного некроза (ОН), наблюдавшийся первоначально, быстро претерпел обратное развитие через 48 часов после пересадки. Обратимый характер острого тубулярного некроза, наряду со способностью пересаженной почки поддерживать длительное выживание реципиента, показал жизнеспособность и функционирование *in vivo* пересаженного органа, который перенес период теплой ишемии продолжительностью более 60 минут. Таким образом, орган, реанимированный с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, после оживления может работать *in vivo*.

B. Аутотрансплантация

В другом варианте орган, реанимированный с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, оценивали на функцию *in vivo* после оживления. Используя двух собак, выполнили аутотрансплантацию путем удаления левых почек, которые затем подтверждались теплой ишемией в бане с физиологическим раствором при 37°C в течение 2 часов. После периода теплой ишемии в почки вставляли канюли и промывали их восстановительным раствором настоящего изобретения, а затем перфузировали их в течение 2 часов, используя способ и восстановительный раствор настоящего изобретения, при температуре 30-32°C. После процесса оживления почки аутотрансплантировали с одновременной нефрэктомией необработанной, контрлатеральной почки. Таким образом, выживание каждой собаки-реципиента целиком зависело от реанимированной почки. Течение посттрансплантационного периода у собак-реципиентов показано на фиг.4 и 5.

Почки хорошо реперфузировались и вырабатывали мочу через часы после пересадки. Почки продолжали вырабатывать мочу в течение всего периода посттрансплантационного наблюдения. Как показано на фиг.4, у обеих собак наблюдался небольшой подъем сывороточного креатинина, согласующийся с ОН. В каждом случае пик сывороточного креатинина наблюдался на третий день после пересадки и составлял 3,5 мг/дл и 2,8 мг/дл, соответственно. Однако уровни сывороточного креатинина возвратились к нормальным значениям через 10 дней после пересадки. Биохимические показатели сыворотки оставались нормальными в течение оставшейся части посттрансплантационного периода.

Как показано на фиг. 5, уровни креатинина в моче быстро возрастали и достигали нормальных пределов за несколько дней до нормализации биохимических показателей сыворотки. После умерщвления животных гистологическое исследование показало практически нормальные почки. Эти исследования

показательны в смысле регенерации эпителия канальцев. Обратимый характер острого тубулярного некроза, наряду со способностью пересаженной почки поддерживать длительное выживание реципиента, показал жизнеспособность и функционирование *in vivo* пересаженного органа, который перенес период теплой ишемии продолжительностью более 2 часов. Таким образом, орган, реанимированный с помощью способа и восстановительного раствора настоящего изобретения, после оживления может работать *in vivo*.

Пример 7 - Сравнение с известными консервирующими растворами

Органы оживляли, применяя способ и восстановительный раствор настоящего изобретения или известный консервирующий раствор (основную культуральную среду RSM-210™ или VIA-SPAN™), а затем сравнивали функцию и гистологию органов. Каждую группу почек, перенесших 60-минутное прекращение кровотока, промывали при 32°C соответствующим раствором, а затем перфузировали в течение 2 часов соответствующим раствором: VIASPAН™ при 4°C или RSM-210™ или восстановительным раствором настоящего изобретения при 30-32°C, используя один и тот же способ оживления. Сравнение средних перфузионных характеристик (давление, скорость тока жидкости и сосудистое сопротивление) и функции органа (концентрация креатинина в моче; гистология) в почках, лишенных кровотока на 60 минут и обработанных соответствующим раствором показано в таблице 5.

Результаты, представленные в таблице 5, показывают, что восстановительный раствор настоящего изобретения обладает способностью восстановления сосудистых характеристик, а также функции ишемически поврежденных органов, превосходящей способности VIASPAН™ и RSM-210™. Например, в почках, промытых и перфузируемых восстановительным раствором настоящего изобретения в процессе оживления, наблюдалась уменьшенная вазоконстриция и более высокие скорости тока жидкости по сравнению с почками, промытыми и перфузируемыми RSM-210™ или VIASPAН™. Также, почки, промытые и перфузируемы восстановительным раствором настоящего изобретения, были единственными, у которых восстановилась их функция, что выражалось в выработке мочи с сопутствующей секрецией креатинина. Гистологически только почки, промытые и перфузируемы восстановительным раствором настоящего изобретения или RSM-210™, были восстановлены и достаточно сохранны, о чем свидетельствовала хорошо сохранившаяся архитектоника почечной ткани. Напротив, почки, промытые и перфузируемы раствором VIASPAН™, обнаруживали признаки гистологического повреждения, включая набухание клубочков и тубулярный некроз. Продемонстрирована превосходная способность, по сравнению с известными специалистам растворами, способа и восстановительного раствора настоящего изобретения преодолевать воздействие

теплой ишемии на органы и поддерживать восстановительный процесс до такой степени, при которой нарушение функции органа может стать обратимым.

Пример 8 - Доставка кислорода во время процесса оживления

Как обсуждалось подробно выше, в одном варианте осуществления настоящего изобретения в композицию восстановительного раствора включают в качестве компонента один или более переносящих кислород агентов. Оценивались эффекты различных переносящих кислород агентов как компонентов восстановительного раствора, и их относительная роль в доставке молекулярного кислорода; а также способность способа и восстановительного раствора настоящего изобретения поддерживать осуществляющийся окислительный метаболизм.

Восстановительный раствор, не содержащий переносящего кислород агента (в таблице 6 обозначен "ВР"); восстановительный раствор, содержащий промытые эритроциты (в таблице 6 обозначен "ВР-ЭР"; 15 об.%); восстановительный раствор, содержащий очищенный гемоглобин (в таблице 6 обозначен "ВР-Гем"; 60 см³/литр коммерческого препарата); и восстановительный раствор, содержащий перфторхимическую эмульсию (в таблице 6 обозначен "ВР-ПХ"; 20 об.%) использовали для оживления почек, перенесших 60-минутную теплую ишемию. Каждую группу почек, перенесших 60-минутное прекращение кровотока, промывали при температуре 30-32 °C, используя соответствующий раствор, а затем перфузировали при 30-32°C в течение 2 часов соответствующим раствором, используя один и тот же способ оживления.

Сравнение средних перфузионных характеристик (давление, скорость тока жидкости и сосудистое сопротивление) и функции органа (концентрация креатинина в моче; гистология) в почках, лишенных кровотока на 60 минут и обработанных соответствующим раствором показано в таблице 6.

Результаты, представленные в таблице 6, показывают, что по мере возрастания концентрации молекулярного кислорода в восстановительном растворе через посредство более эффективного переносящего кислород агента, как компонента восстановительного раствора, функция органа улучшается как результат процесса оживления. Например, эффективные переносящие кислород агенты, перфторхимические или очищенный гемоглобин, обеспечивают более высокую концентрацию молекулярного кислорода, доставляемого в процессе оживления.

Функция почек, обработанных восстановительным раствором, содержащим один из этих переносящих кислород агентов, улучшается по сравнению с функцией почек, обработанных восстановительным раствором, не содержащим добавленного переносящего кислород агента или содержащим менее эффективный переносящий кислород агент. Например, при использовании восстановительного раствора с очищенным гемоглобином или перфторхимическим агентом, согласно настоящему изобретению, средняя концентрация креатинина в моче

R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2

составила 18 мг/дл и 41,8 мг/дл, соответственно. Напротив, когда в процессе оживления не используется оксигенатор, а восстановительный раствор не содержит несущего кислород агента, или содержит низкую концентрацию отмытых эритроцитов, средняя концентрация креатинина в моче составляет 8,4 мг/дл и 8,3 мг/дл, соответственно. Продемонстрирован другой вариант осуществления восстановительного раствора, в котором при добавлении одного или более эффективных переносящих кислород агентов в качестве компонента раствора улучшалась функция ишемически поврежденного органа, обрабатываемого с помощью способа настоящего изобретения.

Пример 9

Способ и восстановительный раствор настоящего изобретения можно применять для преодоления действия теплой ишемии на печень, лишенную кровотока, и поддержания процесса восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление ее функции. Несмотря на то, что время, необходимое для перфузии, может зависеть от продолжительности периода отсутствия кровотока, обработка ишемически поврежденной печени с помощью способа (промывания и перfusion) настоящего изобретения в течение приблизительно 2 часов может быть достаточной для оживления большинства этих органов (например, лишенных кровотока в течение периода времени приблизительно от 0,5 до 4 часов) для восстановления функции органа. Общую функцию печени, а также отдельные аспекты физиологии печени, можно оценить путем определения концентраций компонентов в циркулирующем перфузионном растворе, а также в секрете печени (желчи). Функциональные характеристики печени можно оценить путем определения некоторых параметров, включая, но не ограничиваясь ими, концентрации в желчи желчных солей, холестерина, щелочной фосфатазы; pH желчи и скорость тока жидкости через сосуды печени, потребление кислорода и утилизацию глюкозы (по измерению в перфузионном растворе). Таким образом, согласно способу и растворам, как показано в примерах 1 и 2, ишемически поврежденную печень можно обработать, а затем оценить ее перспективы в отношении метаболической функции.

Пример 10

Способ и восстановительный раствор настоящего изобретения можно применять для преодоления действия теплой ишемии на поджелудочную железу, лишенную кровотока, и поддержания процесса восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление ее нарушенной функции. Несмотря на то, что время, необходимое для перфузии, может зависеть от продолжительности периода отсутствия кровотока, обработка ишемически поврежденной поджелудочной железы с помощью способа (промывания и перfusion) настоящего изобретения в течение приблизительно 2 часов может быть достаточной для оживления большинства этих органов (например, лишенных кровотока в течение периода времени приблизительно от 0,5 до 4 часов) для восстановления функции органа. Общую функцию поджелудочной железы, а также отдельные

аспекты физиологии поджелудочной железы, можно оценить путем определения концентраций компонентов в циркулирующем перфузионном растворе, а также в поджелудочной железе. Функциональные характеристики поджелудочной железы включают концентрации панкреатических ферментов, таких как амилаза, липаза; гормона инсулина; pH, натрий и калий панкреатического секрета, и скорость тока жидкости через сосуды поджелудочной железы, потребление кислорода и утилизацию глюкозы (по измерению в перфузионном растворе). Таким образом, согласно способу и растворам, как показано в примерах 1 и 2, ишемически поврежденную поджелудочную железу можно обработать, а затем оценить ее перспективы в отношении метаболической функции.

Пример 11

Способ и восстановительный раствор настоящего изобретения можно применять для преодоления действия теплой ишемии на сердце, лишенное кровотока, и поддержания процесса восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление его функции. Несмотря на то, что время, необходимое для перфузии, может зависеть от продолжительности периода отсутствия кровотока, обработка ишемически поврежденного сердца с помощью способа (промывания и перfusion) настоящего изобретения в течение приблизительно 2 часов может быть достаточной для оживления большинства этих органов (например, лишенных кровотока в течение периода времени приблизительно от 0,5 до 4 часов) для восстановления нарушенной функции органа. Общую функцию сердца, а также отдельные аспекты физиологии сердца, можно оценить путем определения концентраций компонентов в циркулирующем перфузионном растворе, а также в сердце. Функциональные характеристики сердца включают, но не ограничиваются ими, механическую и электрическую работу, ферменты сердца, такие как трансаминазы (аспартатаминотрансфераза, АСТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), фруктозо-1,6-дифосфат альдолаза (АЛД), малатдегидрогеназа (МДГ), глутатионредуктаза (ГР), креатинфосфоркиназа (КФК), гидроксибутиратдегидрогеназа (ГБД); скорость тока жидкости через сосуды сердца, потребление кислорода и утилизацию глюкозы (по измерению в перфузионном растворе). Таким образом, согласно способу и растворам, как показано в примерах 1 и 2, ишемически поврежденное сердце можно обработать, а затем оценить его перспективы в отношении метаболической функции.

Пример 12

Способ и восстановительный раствор настоящего изобретения можно применять для преодоления действия теплой ишемии на тонкий кишечник, лишенный кровотока, и поддержания процесса восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление его нарушенной функции. Несмотря на то, что время, необходимое для перфузии, может зависеть от продолжительности периода отсутствия кровотока, обработка ишемически поврежденного тонкого кишечника с помощью

C 2 ? 1 9 9 3 1 0 R U

способа (промывания и перфузии) настоящего изобретения в течение приблизительно 2 часов может быть достаточной для оживления большинства этих органов (например, лишенных кровотока в течение периода времени приблизительно от 0,5 до 4 часов) для восстановления функции органа. Общую функцию тонкого кишечника, а также отдельные аспекты физиологии тонкого кишечника, можно оценить путем определения концентраций компонентов в циркулирующем перфузионном растворе, а также в тонком кишечнике. Функциональные характеристики тонкого кишечника можно оценить путем определения некоторых параметров, включающих, но не ограничивающихся ими, функциональные исследования, такие как тесты на стимуляцию кислотообразования в желудке, и тесты на всасывание, с использованием меченых молекул; скорость тока жидкости через сосуды тонкого кишечника, потребление кислорода и утилизацию глюкозы (по измерению в перфузионном растворе). Таким образом, согласно способу и растворам, как показано в примерах 1 и 2, ишемически поврежденный тонкий кишечник можно обработать, а затем оценить его перспективы в отношении метаболической функции.

Пример 13

Способ и восстановительный раствор настоящего изобретения можно применять для преодоления действия теплой ишемии на легкое, лишенное кровотока, и поддержания процесса восстановления до такой степени, при которой возможно восстановление его нарушенной функции. Может быть желательным сначала обработать легочный трансплантат поверхностно-активным веществом непосредственно перед перфузией (см. например, Erasmus et al., 1996, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153:665-670). Несмотря на то, что время, необходимое для перфузии, может зависеть от продолжительности периода отсутствия кровотока, обработка ишемически поврежденного легкого с помощью способа (промывания и перфузии) настоящего изобретения в течение приблизительно 2 часов может быть достаточной для оживления большинства этих органов (например, лишенных кровотока в течение периода времени приблизительно от 0,5 до 4 часов) для восстановления функции органа. Общую легочную функцию, а также отдельные аспекты физиологии легкого можно оценить путем определения концентраций компонентов в циркулирующем перфузионном растворе, таких как сурфактант белок А (СБ-А). Функциональные характеристики легкого можно оценить путем определения некоторых параметров, включающих, но не ограничивающихся ими, ФЖЕЛ (форсированную жизненную емкость легких), ОФВ1 (объем форсированного выдоха за 1 секунду), ПОСВ (пиковую объемную скорость выдоха), АО (средний альвеолярный объем), ОЕЛ (общую емкость легких) и ПСО (перенос оксида углерода). Таким образом, согласно способу и растворам, как показано в примерах 1 и 2, ишемически поврежденное легкое можно обработать, а затем оценить его перспективы в отношении метаболической функции.

Следует понять, что описанные варианты

практического осуществления настоящего изобретения и приведенные примеры служат только целям иллюстрации, а не ограничения, и любые изменения или модификации, которые будут очевидны для опытного специалиста из приведенного выше описания и прилагаемых чертежей, входят в объем прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

Формула изобретения:

1. Способ восстановления органа для трансплантации, находящегося в прелатальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, и при котором нарушения функции становятся обратимыми, указанный способ включает промывание органа при температуре приблизительно 28 - 37°C содержащим буфер физиологическим раствором для удаления крови и ацидотических продуктов, накопившихся в органе за период отсутствия кровотока; и перфузию органа при температуре около 28 - 37°C содержащим буфер физиологическим раствором, который дополнительно включает средства для расширения кровеносных сосудов в органе, трофические факторы с целью восстановления клеточной целостности и клеточной функции, восстанавливающие таким образом функцию органа, и средства для восстановления окислительного метаболизма в органе при реадаптации органа к оксигенированной среде.
2. Способ по п.1, при котором содержащий буфер физиологический раствор для перфузии органа дополнительно включает вазодилататоры и антиоксиданты в качестве средств для предотвращения повреждения тканей во время возобновления кровотока в органе.
3. Способ по п.1, при котором средства для восстановления окислительного метаболизма включают введение молекулярного кислорода посредством добавления оксигенатора или переносящего кислород агента.
4. Способ по п.1, при котором перфузию осуществляют с помощью устройства, включающего ламинарную или пульсирующую насосную систему для доставки содержащего буфер физиологического раствора; указанное устройство дополнительно включает средства для обеспечения и контроля перфузии и перфузионного давления, средства для контроля температуры и средства для обеспечения и контроля введения и выведения дыхательных газов, а также средства для тестирования или сбора для тестирования содержащего буфер физиологического раствора, который уже прошел через орган к монитору, и измерения одной или более функциональных характеристик, таких, как pH, различные виды давления, скорость тока жидкости, сосудистое сопротивление, различные химические составляющие, оксигенация, концентрация диоксида углерода и потребление кислорода.
5. Способ по п.4, при котором перфузию осуществляют с помощью второго устройства, соединенного с первым устройством, для тестирования или сбора для тестирования продукта, вырабатываемого органом, причем последующее определение параметров продукта, вырабатываемого органом,

R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2

R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2

соносится с целостностью и функцией органа.

6. Способ восстановления и ингибирования дальнейшего ишемического повреждения органа для трансплантации, находящегося в прелептальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушения функции органа становятся обратимыми, указанный способ осуществляется при температуре около 28 - 37°C и включает: (а) промывание органа содержащим буфер физиологическим раствором, который удаляет кровь и ацидотические продукты, накопившиеся в органе за период отсутствия кровотока, и дополнительно включает средства для восстановления физиологического рН органа, средства для расширения микрососудов в органе, средства для поддержания продолжающегося анаэробного метаболизма, метаболические субстраты для восполнения пула адениновых соединений, поддерживания цикла лимонной кислоты и восстановления системы транспорта электронных пар для инициирования перехода от анаэробного метаболизма к окислительному метаболизму, трофические факторы для восстановления функции органа, обеспечивая таким образом метаболиты для восстановления клеточной целостности и клеточной функции; и (б) перфузию органа содержащим буфер физиологическим раствором, который дополнительно включает средства для нормализации снабжения органа кислородом и рН органа, средства для расширения кровеносных сосудов в органе и трофические факторы для восстановления функции органа, обеспечивая таким образом метаболиты для восстановления клеточной целостности и клеточной функции.

7. Способ по п.6, при котором содержащий буфер физиологический раствор для перфузии органа дополнительно включает вазодилататоры и антиоксиданты в качестве средств для предотвращения повреждения тканей во время возобновления кровотока в органе.

8. Способ по п.6, при котором средства для восстановления окислительного метаболизма включают введение молекулярного кислорода посредством добавления оксигенатора или переносящего кислород агента.

9. Способ по п.6, при котором перфузию осуществляют с помощью устройства, включающего ламинарную или пульсирующую насосную систему для доставки содержащего буфер физиологического раствора; указанное устройство дополнительно включает средства для обеспечения и контроля перфузии и перфузионного давления, средства для контроля температуры и средства для обеспечения и контроля введения и выведения дыхательных газов, а также средства для тестирования или сбора для тестирования содержащего буфер физиологического раствора, который уже прошел через орган к монитору, и измерения одной или более функциональных характеристик, таких, как рН, различные виды давления, скорость тока жидкости, сосудистое сопротивление, различные химические составляющие, оксигенация, концентрация диоксида углерода и потребление кислорода.

10. Способ по п.9, при котором перфузию осуществляют с помощью второго устройства, соединенного с первым устройством, для тестирования или сбора для тестирования продукта, вырабатываемого органом, причем последующее определение параметров продукта, вырабатываемого органом, соносится с целостностью и функцией органа.

11. Восстановительный раствор для восстановления и ингибирования дальнейшего ишемического повреждения органа для трансплантации, находящегося в прелептальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушения функции органа становятся обратимыми в органе, лишенном кровотока, указанный восстановительный раствор включает содержащий буфер физиологический раствор и дополнительно включает вазодилататоры в физиологически эффективном количестве для расширения кровеносных сосудов органа, химические энергетические субстраты в физиологически эффективном количестве для восстановления окислительного метаболизма, прекратившегося в период отсутствия кровотока в органе, и трофические факторы в физиологически эффективном количестве для ускорения одного или более восстановительных процессов в клетках с целью восстановления клеточной функции, утраченной в период отсутствия кровотока.

12. Восстановительный раствор по п.11, в котором вазодилататоры включают комбинацию компонентов, выбранных из группы, состоящей из субстратов для вазодилатации, опосредуемой эндотелиальными клетками, субстратов для расширения микрососудов, блокаторов кальциевых каналов.

13. Восстановительный раствор по п.12, в котором субстраты для вазодилатации, опосредуемой эндотелиальными клетками, включают ацетилхолин и аргинин, субстраты для расширения микрососудов включают простациклин и Mg⁺, а блокаторы кальциевых каналов включают аденоzin и верапамил.

14. Восстановительный раствор по п.11, в котором химические энергетические субстраты включают комбинацию компонентов, выбранных из группы, состоящей из компонентов пула адениновых соединений, компонентов цикла лимонной кислоты и компонентов цепочки транспорта электронных пар.

15. Восстановительный раствор по п.14, в котором химические энергетические субстраты выбирают из группы, состоящей из пируата, глюкозы, АТФ, АМФ, кофермента А, β-никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺), флавинадениндинуклеотида (ФАД), тиаминпирофосфат хлорида (кокарбоксилазы), УТФ, хлорида, магния и их комбинаций.

16. Восстановительный раствор по п.11, в котором трофические факторы выбирают из группы, состоящей из аминокислот, магния, производных нуклеиновых кислот, рибонуклеозидов, кислого фактора роста фибробластов (ФРФ), основного ФРФ, гепарина и хондроитинсульфата и их комбинаций.

17. Восстановительный раствор по п.11,

R
U
2
1
9
9
3
1
0
C
2

RU
2199310C2

который дополнительно включает физиологически эффективное количество компонента, выбранного из группы, состоящей из антиоксиданта, переносящего кислород агента и их комбинаций.

18. Восстановительный раствор по п.11, который дополнительно включает фармакологически эффективное количество нейропротекторного лекарственного средства.

19. Способ восстановления органа для трансплантации, находящегося в прелетальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушение функции органа становится обратимым, указанный способ осуществляется при температуре около 28 - 37°C и включает промывание органа и перфузию органа восстановительным раствором по п.11.

20. Способ восстановления органа для трансплантации, находящегося в прелетальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушение функции органа становится обратимым, указанный способ осуществляется при температуре около 28 - 37°C и включает промывание органа восстановительным раствором по п.17.

21. Способ восстановления и ингибирования дальнейшего ишемического повреждения органа для трансплантации, находящегося в прелетальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушение функции органа становится обратимым, указанный способ осуществляется при температуре около 28 - 37°C и включает промывание и перфузию органа восстановительным раствором по п.11.

22. Способ восстановления и ингибирования дальнейшего ишемического повреждения органа для трансплантации, находящегося в прелетальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушение функции органа становится обратимым, указанный способ осуществляется при температуре около 28 - 37°C и включает промывание и перфузию органа восстановительным раствором по п.17.

23. Способ приготовления раствора для восстановления и ингибирования дальнейшего ишемического повреждения органа для трансплантации, находящегося в прелетальной фазе ишемии, когда такое восстановление еще возможно, при котором нарушение функции органа становится обратимым, включающий добавление к содержащему буфер физиологическому раствору комбинации добавочных веществ, включающих вазодилататоры в физиологически эффективном количестве для расширения кровеносных сосудов органа; химические энергетические субстраты в

5 физиологически эффективном количестве для восстановления окислительного метаболизма, прекратившегося в период отсутствия кровотока в органе, и трофические факторы в физиологически эффективном количестве для ускорения одного или более восстановительных процессов в клетках с целью восстановления клеточной функции, утраченной в период отсутствия кровотока, где pH указанного раствора доводят до значений в пределах около 6,5 - 7,5, а его осmolлярность превышает 330 мОsm.

10 24. Способ по п.23, при котором вазодилататоры включают комбинацию компонентов, выбранных из группы, состоящей из субстратов для вазодилатации, опосредуемой эндотелиальными клетками, субстратов для расширения микрососудов, блокаторов кальциевых каналов и их комбинаций.

15 25. Способ по п.24, при котором субстраты для вазодилатации, опосредуемой эндотелиальными клетками, включают ацетилхолин и аргинин, субстраты для расширения микрососудов включают простациклин и Mg⁺, а блокаторы кальциевых каналов включают еденозин и верапамил.

20 26. Способ по п. 23, при котором химические энергетические субстраты включают комбинацию компонентов, выбранных из группы, состоящей из компонентов пула адениновых соединений, компонентов цикла лимонной кислоты и компонентов цепочки транспорта электронных пар.

25 27. Способ по п.26, при котором химические энергетические субстраты выбирают из группы, состоящей из пирувата, глюкозы, АТФ, АМФ, кофермента А, β-никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺), β-никотинамидаденинтрилокеотида (НАДН), флавинадениндинуклеотида (ФАД), тиаминпирофосфат хлорида (кокарбоксилазы), УТФ, хлорида, магния и их комбинаций.

30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 976

R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2

R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2

RU 2199310 C2

Таблица 1

Дополнительные вещества, добавляемые к основному раствору
(количества в миллиграммах на литр основного раствора)

Вазодилататоры	Количество
аргинин	140
ацетилхолин	2
верапамил	0,2
простациклин	0,06
магний	600
Химические энергетические субстраты	
АТФ	2
АМФ	2
УТФ	4
Кофермент А	10
дифосфориридиннуклеотид	28
ФАД	4
трифосфориридиннуклеотид натрий	4
кокарбоксилаза	4
Трофические факторы	
кислый и/или основной ФРФ	200
пируват	220
глюкоза	2 000
гепарин	180
инсулин	10
(Производные нуклеиновых кислот)	
дезоксиаденозин	40
дезоксигуанозин	40
дезоксизитидин	40
тимидин	40
(Рибонуклеотиды)	
аденозин	40
цитидин	40
гуанозин	40
уридин	40

RU 2199310 C2

Таблица 2

Параметры	Нормальные	Ишемические
количество почек	25	5
среднее давление	50/30	44/40
средняя скорость тока жидкости	>95 см ³ /мин	12,9 см ³ /мин
среднее сосудистое сопротивление	0,4	3,26
выработка мочи	есть	нет

Таблица 3

Параметры	30 минут ишемии	60 минут ишемии
	+ р-р изобретения	
количество почек	5	16
среднее давление	44/40	54/25
средняя скорость тока жидкости	12,9 см ³ /мин	97,4 см ³ /мин
среднее сосудистое сопротивление	3,26	0,47
выработка мочи	нет	есть

RU 2199310 C2

RU 2199310 C2

Таблица 4

Параметры	60' (N=16)	90' (N=5)	120' (N=5)	240' (N=2)
давление (мм рт.ст.)	54/25	58/37	55/37	52/40
скорость тока жидкости (см ³ /мин)	97,4	72	68,6	36,5
сосудистое сопротивление	0,47	0,67	0,73	1,27
креатинин (мг/дл)	41,8	22,9	18,5	23,5
гистология	хорошо сохранившаяся	хорошо сохранившаяся, с точечными очагами уплощенного эпителия	в целом хорошо; с точечными очагами отеков	точечный ранний некроз

RU 2199310 C2

RU 2199310 C2

Таблица 5

Параметры	Восстановительный раствор	RSM-210™	VIASPAN™
давление (мм рт.ст.)	54/25	44/40	54/46
скорость тока жидкости (см ³ /мин)	97,4	12,9	27
сосудистое сопротивление	0,47	3,25	1,8
креатинин (мг/дл)	41,8	нет мочи	нет мочи
гистология	хорошо сохранившаяся	хорошо сохранившаяся	набухание клубочек, ранний тубулярный некроз

RU 2199310 C2

RU 2199310 C2

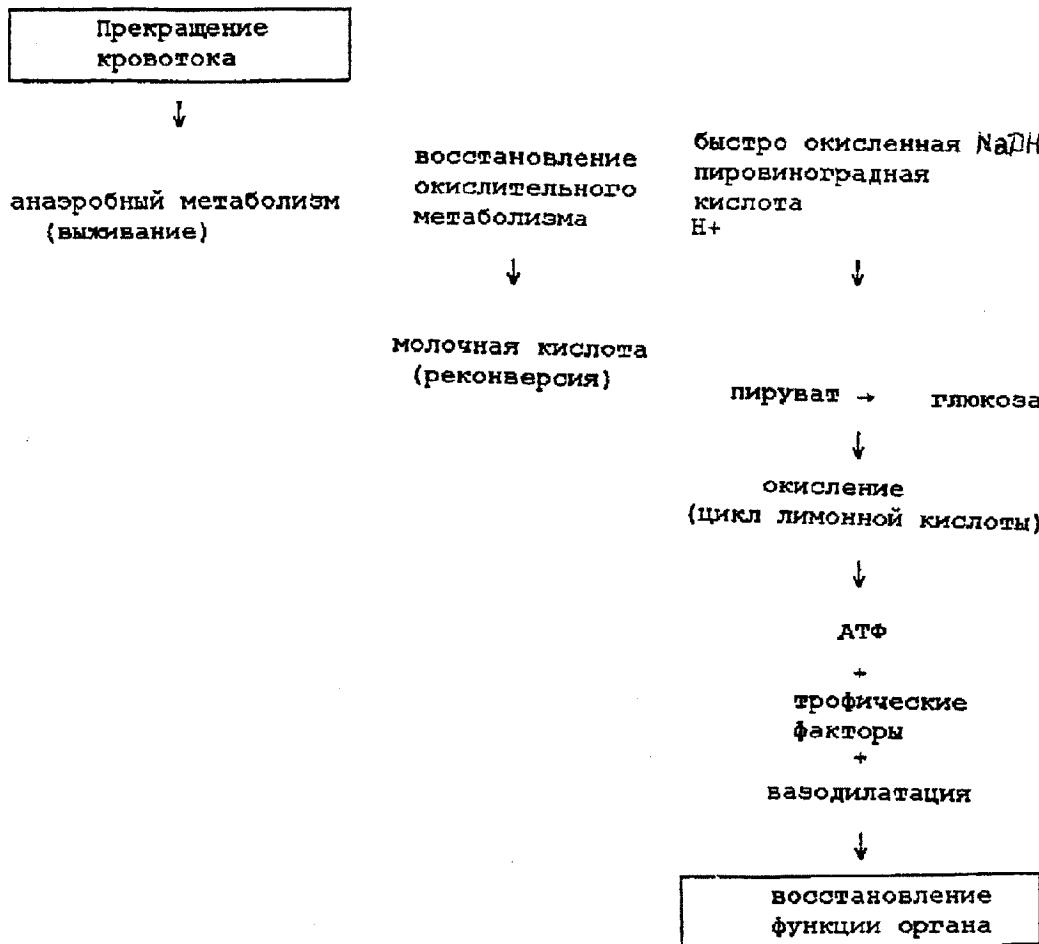
Таблица 6

Раствор	давление (мм рт. Ст.)	скорость тока кости (см ³ /мин)	сосудис- тое соп- ротивле- ние	креати- нин	гистоло- гия
ВР	54/38	92,3	0,50	8,4	хорошо сохрани- вшиеся
ВР-ЭР	56/36	98,2	0,58	8,3	хорошо сохра- нившиеся
ВР-Гем	58/42	66,67	0,75	18	хорошо сохрани- вшиеся
ВР-ПФХ	54/25	97,4	0,47	41,8	хорошо сохрани- вшиеся

RU 2199310 C2

RU 2199310 C2

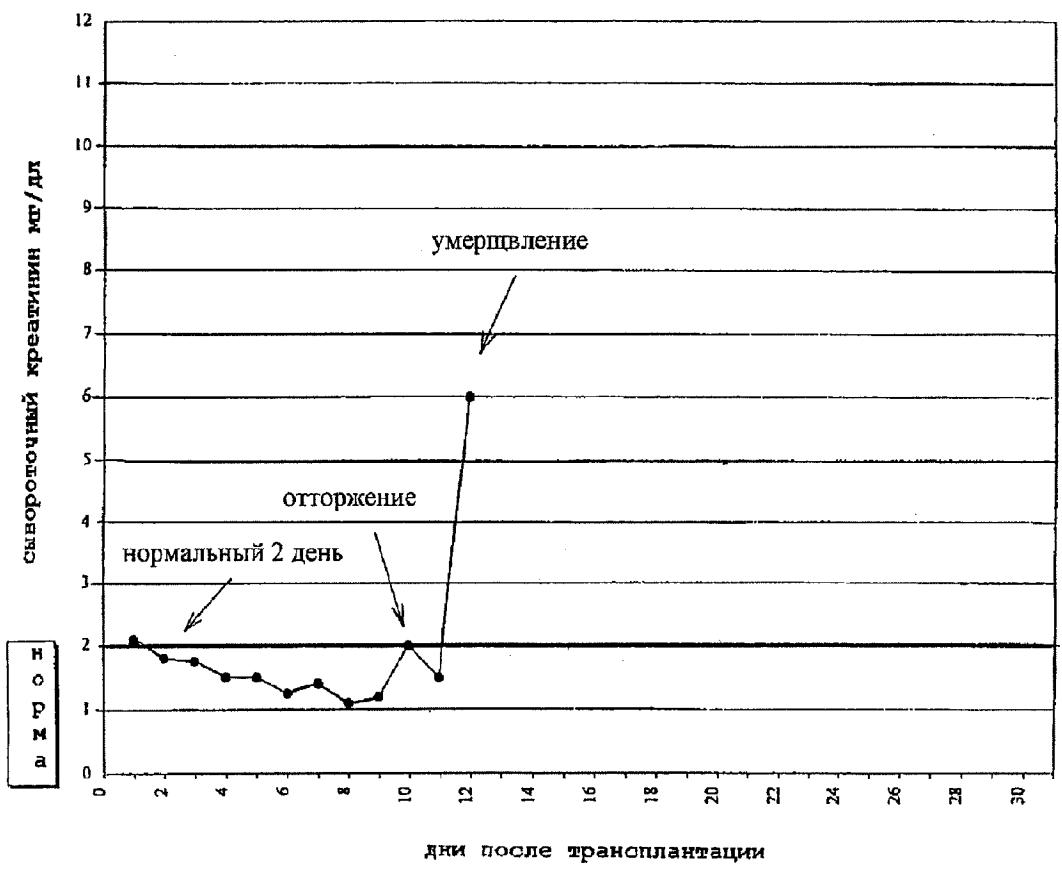
RU 2 1 9 9 3 1 0 C 2



Фиг.1

RU 2 1 9 9 3 1 0 C 2

аллотрансплантация после
60-минутной теплой ишемии



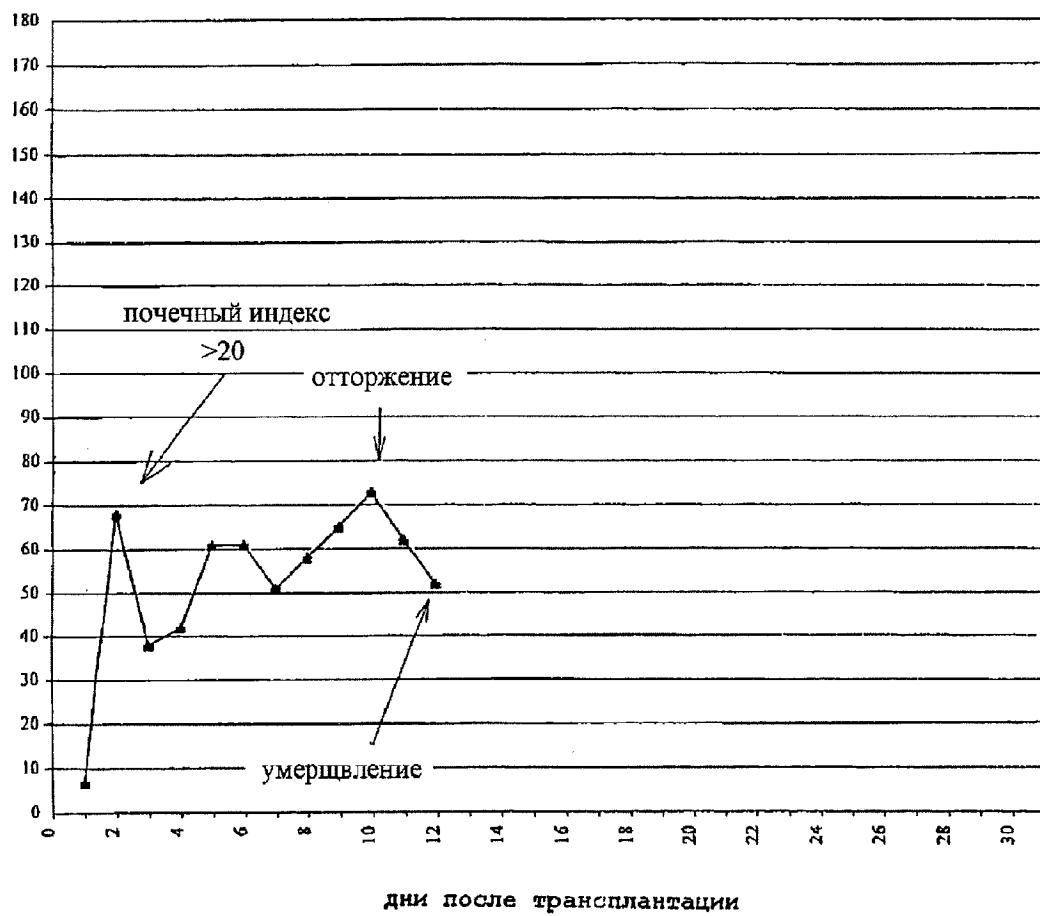
Фиг.2

R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2

R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2

R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2

аллотрансплантация после
60-минутной теплой ишемии

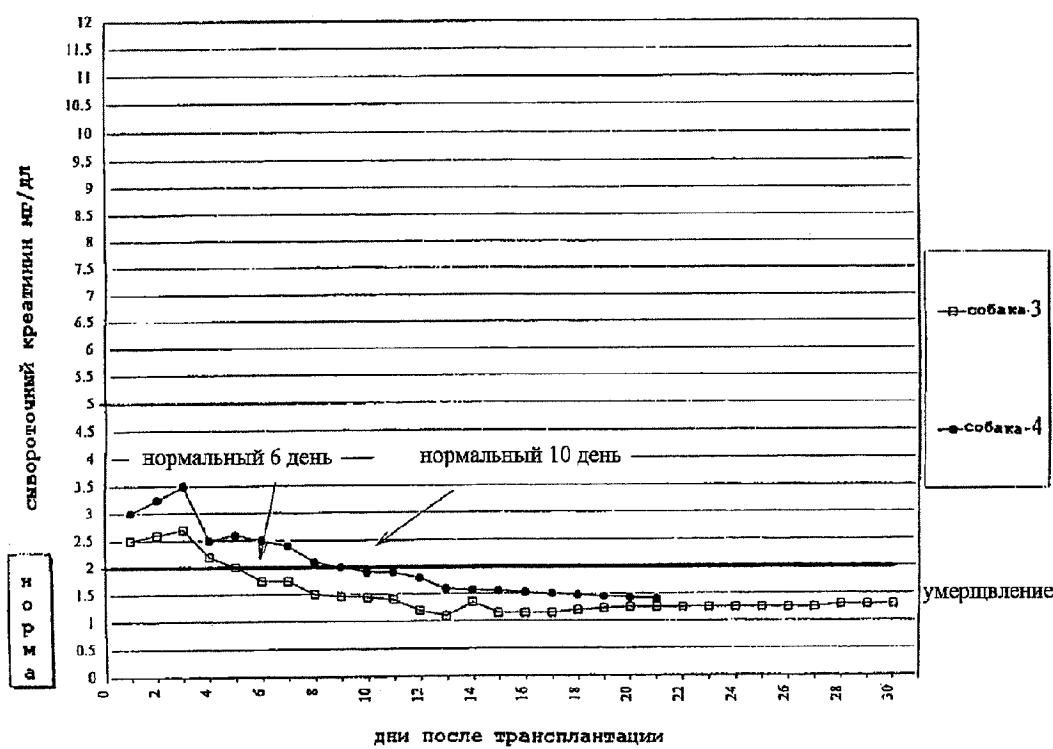


Фиг.3

R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2

R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2

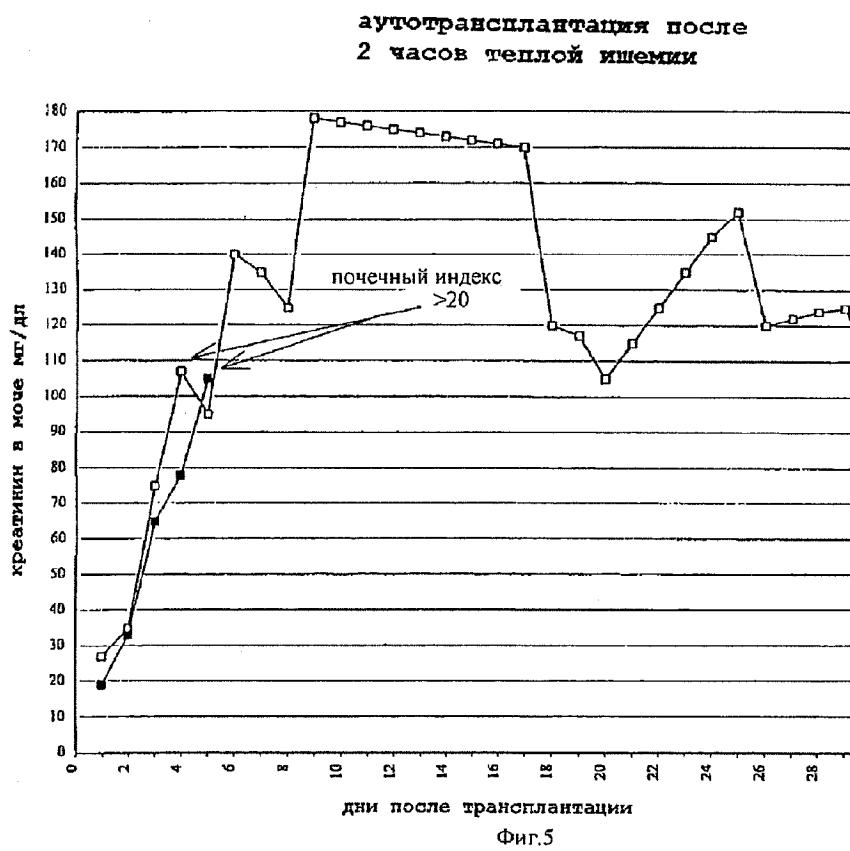
автотрансплантация после
2 часов теплой ишемии



Фиг.4

R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2

R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2



R U 2 1 9 9 3 1 0 C 2